



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Activated p53 with histone deacetylase inhibitor enhances L-fucose-mediated drug delivery through induction of fucosyltransferase 8 expression in hepatocellular carcinoma cells (ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による p53 活性化を介した FUT8 発現上昇は肝癌細胞に対するフコース標的療法の効果を増強する)
Author(s) 著 者	岡川, 泰
Degree number 学位記番号	甲第 2866 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2016-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2866 号	氏 名	岡川 泰
<p>Activated p53 with histone deacetylase inhibitor enhances L-fucose-mediated drug delivery through induction of fucosyltransferase 8 expression in hepatocellular carcinoma cells ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による p53 活性化を介した FUT8 発現上昇は肝癌細胞に対するフコース標的療法の効果を増強する</p> <p><u>研究目的</u></p> <p>肝細胞癌(HCC)は世界で 6 番目に多い悪性腫瘍であり、癌死亡原因第 2 位の疾患である。遠隔転移を有する症例や局所治療が困難な症例には Sorafenib が適応であり、本邦においても臨床応用されている。しかしながら、HCC に対する Sorafenib 治療の生存期間中央値は 10.7 カ月と十分な成績ではない。</p> <p>フコースは、細胞における様々な分子の修飾に用いられる単糖であり、詳細なメカニズムは明らかにされていないが、癌患者の血清や尿でフコース濃度の増加が報告されている。フコシル化にはフコース転移酵素(FUTs)が必要であり、これまで 11 種類の FUTs が見出されている。FUT8 は唯一の $\alpha 1,6$FUT であり、HCC、肺癌、甲状腺癌、前立腺癌でその発現増加が報告されている。HCC の腫瘍マーカーである AFP-L3 は、AFP の持つ糖鎖に FUT8 によりフコースが修飾されたものである。AFP-L3 は疾患特異性が高いのみならず、予後因子の一つとして有用である。</p> <p>一方、p53 の変異は多くの悪性腫瘍で報告されている。HCC においても約 25%に p53 の変異が認められることから、肝発癌や HCC の進行に関与していると考えられている。また、p53 は極めて重要な転写因子の一つでもあり、多様なシグナル伝達経路の調節に関わっている。</p> <p>FUT8 および p53 は、HCC の発症・進展に関与していることが示唆されているが、これまで FUT8 と p53 の関連性について解析した報告はない。そこで本研究では、FUT8 の発現に p53 が転写因子として作用するか否かを明らかにすることを目的とした。また、われわれはフコシル化蛋白産生水癌細胞に対するフコース結合リポソーム(Fuc-Lip)を用いた細胞標的療法の有効性を明らかにしてきた(PLoS One, 2012)。AFP-L3 産生 HCC においても、フコース要求度が上昇していることが想定された。したがって、同細胞への Fuc-Lip の特異的な送達を証明すると同時に、p53 が FUT8 を活性化することにより、Fuc-Lip の細胞への送達効果が上昇するかを検討することとした。さらに、Sorafenib 内包化 Fuc-Lip の AFP-L3 産生 HCC 細胞に対する抗腫瘍効果を、p53 賦活化剤である histone deacetylase inhibitor(HDACi)存在下に <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で解析することを目的とした。</p> <p><u>研究方法</u></p> <p>1) <i>FUT8</i> のプロモーター領域に p53 の結合部位を検索</p>			

*FUT8*のプロモーター領域にゲノム解析ツール TFBIND を用いて、p53 の DNA 結合コンセンサス部位を検索した。

2) p53 活性化および p53 不活化による *FUT8* 蛋白の変化の検討

FUT8 は p53 の転写標的分子である可能性がある。そこで、HepG2 細胞に adenovirus-p53 (Ad-p53) を感染させることで wild type(wt)-p53 を強制発現させ、ウエスタンブロット法で *FUT8* 蛋白の変化を検討した。また siRNA にて p53 を knock down し、*FUT8* 蛋白の変化を検討した。

3) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay による p53 の結合部位の検討

HepG2 に Ad-p53 あるいは adenovirus-LacZ を感染させ、sonication 後に p53 抗体で免疫沈降し、DNA を抽出した。p53 の DNA 結合コンセンサス部位のプライマーを設計・作製し、得られた DNA を PCR 法で増幅後、2%ゲルに泳動した。

4) 細胞株のスクリーニング

HCC 細胞株(HepG2, JHH7, JHH6)における p53 の発現の有無をウエスタンブロット法にて検討した。また、AFP-L3 産生性を解析するため、培養細胞の上清を用い、ELISA 法にて AFP 濃度を測定した。さらに細胞上清を AFP 抗体で免疫沈降後、レクチン抗体でウエスタンブロットし、全体の AFP のバンドとの比から、AFP-L3 の濃度を定量した。

5) フコース結合リポソームの作成

リポソームへのフコース結合は、リポソームにヒト血清アルブミンを結合し、アミノ化フコースを 3,3'-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate](DTSSP)を介して結合した。この際、フコースの濃度を 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ の 3 種類とし、それぞれ F0, F25, F50 とした。*in vitro*, *in vivo* において Fuc-Lip の取り込みを解析するため、Cy5.5 を内包化し(F0-Lip-Cy5.5, F25-Lip-Cy5.5, F50-Lip-Cy5.5), 抗腫瘍効果を検討するために Sorafenib を内包化した(F0-Lip-Sorafenib, F50-Lip-Sorafenib)。リポソームの平均粒子径と Z ポテンシャルを動的光散乱法、Sorafenib の濃度を蛍光定量にて測定した。

6) HDACi による *FUT8* 蛋白の変化の検討

我々は以前に HDACi が p53 を活性化することを報告した(Cancer Res, 2003)。そこで HDACi である suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)を HCC 細胞に暴露し、p53 を活性化させ、*FUT8* 蛋白の変化を検討した。SAHA は 0, 1, 5 μM の濃度で 6 時間暴露した。PBS で 2 回洗浄し、48 時間培養後、ウエスタンブロット法にて *FUT8* の蛋白発現が増加するか検討した。

7) Flow cytometry による Fuc-Lip-Cy5.5 の細胞内への取り込み

各細胞株をプレートに 5×10^5 個ずつ撒き、24 時間後に F0-Lip-Cy5.5, F25-Lip-Cy5.5, F50-Lip-Cy5.5 を 30 分暴露し、その取り込みを Flow cytometry で検討した。また、同時に SAHA 処理による Fuc-Lip-Cy5.5 の細胞内への取り込みの変化を検討した。

8) BrdU assay による細胞株での抗腫瘍効果

各種 HCC 細胞株を 96well プレートに 5×10^3 個ずつ撒き、24 時間培養後に F0-Lip-Sorafenib, F50-Lip-Sorafenib を 2 時間暴露した。その後、PBS で 2 回洗浄し、48 時間培養後に生細胞を BrdU assay で検討した。Sorafenib の濃度は 0 - 10 μM で検討した。さらに各種細胞株を 5×10^3 個ずつ

撒き、24 時間培養後に SAHA を 1 μ M の濃度で 6 時間加え、その後、F0-Lip-Sorafenib, F50-Lip-Sorafenib を 2 時間暴露し、PBS で洗浄後、48 時間培養し生細胞を BrdU assay で検討した。

9) 皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果の解析

皮下腫瘍モデルを AFP-L3 高産生株である HepG2 を 2 \times 10⁶ 個接種し作製した。腫瘍径が 5 mm となった段階で、Vehicle 群、SAHA(1 mg/kg) 群、F0-Lip-Sorafenib(1 mg/kg) 群、F50-Lip-Sorafenib(1 mg/kg) 群、F50-Lip-Sorafenib(1 mg/kg)+SAHA(1 mg/kg) 群に分け治療を開始した。SAHA は腹腔内投与とし、Fuc-Lip-Sorafenib は尾静脈より週に 2 回投与した。投与開始後、週 2 回、腫瘍径を計測した。なお、D-マンノース 5 mg を治療の 5 分前に尾静脈より投与した。

10) 皮下腫瘍モデルの病理組織学的検討

皮下腫瘍モデルを治療開始 45 日目に解剖し、腫瘍部を切り出した。HE 染色、TUNEL 染色を行い、病理組織学的検討を行った。

研究成績

1) *FUT8* のプロモーター領域に p53 の結合部位を検索

FUT8 のプロモーター領域に p53 の DNA 結合コンセンサス配列が 2 か所存在していた。コンセンサス結合配列の合致率はそれぞれ 80%, 60% であり、binding site(BS)-1, BS-2 とした。

2) p53 活性化および p53 不活化による *FUT8* 蛋白の変化の検討

HepG2 細胞に Ad-p53 を感染させ p53 を強制発現させたところ、*FUT8* 蛋白の発現が増加した。また p53 を siRNA で knock down したところ、*FUT8* 蛋白の発現は低下し、*FUT8* の発現は p53 依存的であることが示唆された。

3) ChIP assay による p53 の結合部位の検討

ChIP assay の結果、p53 は BS-1 に結合することが示された。

4) 細胞株のスクリーニング

ウエスタンブロットの結果、HepG2 および JHH7 で p53 が検出され、JHH6 では p53 は検出されなかった。また AFP-L3 の産生は HepG2 および JHH7 で認められたが、JHH6 では認められなかった。

5) フコース結合リポソームの作成

Cy5.5 内包化リポソーム(F0-Lip-Cy5.5, F25-Lip-Cy5.5, F50-Lip-Cy5.5)および Sorafenib 内包化リポソーム(F0-Lip-Sorafenib, F50-lip-Sorafnib)の作製に成功した。平均粒子径は約 80 - 90nm(Cy5.5 内包時)、約 120nm(Sorafenib 内包時)で、F0~F50 まで均一であった。Z ポテンシャルいずれも -80mV 未満であった。内包化された Sorafenib の濃度は 1 mg/ml であった。

6) HDACi による *FUT8* 蛋白の変化の検討

HepG2 および JHH6 に SAHA を暴露し、ウエスタンブロットを施行したところ、wt-p53 を有する HepG2 で *FUT8* 蛋白の増加が認められた。

7) Flow cytometry による Fuc-Lip-Cy5.5 の細胞内への取り込みの検討

AFP-L3 産生株である HepG2, JHH7 では F0, F25, F50-Lip-Cy5.5 の順に, Cy5.5 の細胞内への取り込みの増加が観察された. また, SAHA の併用でその取り込みはさらに増加した.

8) BrdU assay による細胞株での抗腫瘍効果の検討

AFP-L3 産生株である HepG2, JHH7 において, F0-Lip-Sorafenib に比較し, F50-Lip-Sorafenib でフコース濃度依存性に抗腫瘍効果を認めた. また, SAHA の併用により, F50-Lip-Sorafenib の抗腫瘍効果が増加した.

9) 皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果の解析

Vehicle 群, F0-Lip-Sorafenib 群と比較し, F50-Lip-Sorafenib 群で有意に腫瘍増殖は抑制されていた. また F50-Lip-Sorafenib+SAHA 群では最も高い抗腫瘍効果を認めた. 体重減少などの有害事象は認めなかった.

10) 皮下腫瘍モデルの病理組織学的検討

HE 染色では, F50-Lip-Sorafenib+SAHA 群で最も腫瘍細胞数が少なく, また TUNEL 染色では大多数の細胞にアポトーシスが誘導されていた.

考察

本研究の結果から, HCC では, p53 が FUT8 の転写因子の一つであることをはじめて見出し, p53 によって FUT8 が活性化され, AFP-L3 産生が増加する可能性が示唆された. また, wt-p53 を有する HCC 細胞では, HDACi の暴露により FUT8 蛋白の増加を認め, HDACi は p53 の活性化を介して, FUT8 の発現上昇に寄与すると考えられた.

一方, 本研究においてはフコースが HCC 細胞内へ取り込まれる機序は不明のままである. 推定される機序は, 拡散あるいはフコース受容体を介したものである. 我々のこれまでの検討結果から, フコースの細胞内への取り込みはフコース受容体を介していることが示唆されている. しかしながら, フコース受容体はクローニングされておらず, 今後のさらなる詳細な解析が必要である.

HCC は多くの化学療法に耐性を示し, 難治性である. Fuc-Lip は AFP-L3 産生 HCC 細胞に特異的に送達可能である. さらに, HDACi との併用は, Fuc-Lip-Sorafenib の HCC 細胞への送達効率を上昇させ, 抗腫瘍効果を増強させることができ, HCC に対する新規細胞標的療法として発展する可能性があると考ええる.

結論

HDACi と Fuc-Lip-Sorafenib の併用療法は, AFP-L3 産生 HCC に対して有効な細胞標的療法になり得る可能性が示唆された.

論文審査の要旨及び担当者

(平成 28 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2866 号	氏 名	岡川 泰
論文審査 担 当 者	主査 教授 加藤 淳二	副査 教授 鳥越 俊彦	
	委員 教授 竹政 伊知朗	委員 教授 時野 隆至	

論文題名	Activated p53 with histone deacetylase inhibitor enhances L-fucose-mediated drug delivery through induction of fucosyltransferase 8 expression in hepatocellular carcinoma cells (ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による p53 活性化を介した FUT8 発現上昇は肝癌細胞に対するフコース標的療法の効果を増強する)
結果の要旨	
<p>本研究では、ChIP assay により p53 が FUT8 の転写因子の一つであることを見出した。また、HCC 細胞において、HDACi の添加により p53 が活性化され、FUT8 の発現上昇が惹起されることを明らかにした。さらに、Sorafenib 内包化フコース結合リポソームによる細胞標的療法の有用性について検討し、HCC 細胞への特異的な送達性と高い抗腫瘍効果を確認した。またその効果が HDACi の併用でさらに増加することを確認した。</p> <p>本研究は、Sorafenib 内包化フコース結合リポソームと HDACi の併用が、肝細胞癌に対する新規治療戦略となる可能性を示唆し、学位論文として十分に値するものであると考えられた。</p>	